

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

共聚合物高分子在 DNA 毛細管電泳分離之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-032-017-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：吳俊弘

計畫參與人員：楊承熹 王文政 彭士峰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 24 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

共聚合物高分子在 DNA 毛細管電泳分離之應用

The application of block copolymer solutions in DNA separation by capillary electrophoresis

計畫編號：92-2113-M-032-017-

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：吳俊弘 淡江大學化學系

一、中文摘要

本研究的主要目的是希望找尋適當的毛細管電泳分離介質及條件，以達到方便且快速的單股及雙股去氧核糖核酸(ssDNA 和 dsDNA)分離效果。三嵌段共聚合物 F127，即 $\text{EO}_{99}\text{PO}_{69}\text{EO}_{99}$ (其中 EO 和 PO 分別為環氧乙烷和環聚氧丙烷)，所形成的微胞膠狀結構，可經由添加不同直鏈高分子如 PEO(聚環氧乙烷)或 PPO(聚環氧丙烷)，來調節其孔洞大小及分佈情形。我們發現在 25% F127 中加入適量的 PEG400、PPG400、PEG4000、或 PEG8000，對 dsDNA 有很好的分離效果，但 DNA 的 UV 吸收峰次序卻發生嚴重錯亂。但是當我們在分離介質中添加 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴乙錠(簡稱 EB)，則可以得到很好的 dsDNA 分離解析效果，以及正確的吸收峰次序。30% F127 + 8% PEG8000 的組成可以將 20 個 ssDNA 片段(來自兩組 ssDNA 樣品，其中包括相同長度但不同鹼基組成的 ssDNA)完全解析開。我們針對四種 dsDNA 樣品(其中包含完全互補、單點鹼基配對錯誤、以及具有兩個鹼基或三個鹼基所形成凸起的 dsDNA)，進行毛細管電泳分離，發現當我們在 30% F127 + 12% PEG8000 的組成中加入 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 EB，就能將上述四種 DNA 完全分離開來。此外，兩種相同大小 dsDNA 只有一對鹼基對不同(即單點突變)可由加入適當濃度正二價離子如： Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 或 Co^{2+} 於 30% F127 + 12% PEG8000 的分離介質中加以分離解析。

關鍵詞：微胞膠、毛細管電泳、DNA 分離

Abstract:

The main purpose of this research was to find appropriate separation mediums and conditions for convenient and fast ssDNA and dsDNA separations by capillary electrophoresis. The micellar gel structure of triblock copolymer F127, $\text{EO}_{99}\text{PO}_{69}\text{EO}_{99}$ (EO and PO being ethylene oxide and propylene oxide, respectively), could be adjusted to modify the pore size and its distribution with the additions of two homopolymers, PEO (polyethylene oxide) and PPO (polypropylene oxide). We found that the addition of PEG400, PPG400, PEG4000, or PEG8000 into 25% F127 would result in good separation resolution for dsDNA, but anomalous DNA elution orders were also observed. With the addition of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide (EB) we could obtain good dsDNA separation resolution and correct elution order of DNA peaks by using these separation mediums. Two sets of ssDNA samples (consisting of twenty oligonucleotides with some of them having the same sizes but different base compositions), could be completely resolved by using 30% F127 + 8% PEG8000 as separation medium. Homoduplex DNA mixing with three heteroduplex DNAs including one mismatch DNA and two bulge DNAs could be resolved in gel composition of 30% F127 + 12% PEG8000 with the addition of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB. Two dsDNAs having the same size but differing in only

one base pair could be separated in 30% F127 + 12% PEG8000 with the addition of appropriate amount of divalent cations such as Mg^{2+} , Zn^{2+} or Co^{2+} .

Keywords: micellar gel, capillary electrophoresis, DNA separation

二、緣由與目的

毛細管電泳在雙股和單股 DNA 的分離，較一傳統平面膠電泳有效率[1]，因其具較高程度的自動化。早期毛管柱內的填充物多為傳統之交連性膠體[2-6]。但此類膠體合成再現性不高，而且常因所施加的高電壓而導致崩潰；小氣泡的生成，也會減短管柱的壽命，而且無法更換填充物。因此許多研究者以形成動態交連性網絡的線性高分子溶液來代替化學交連膠，作為分離 DNA 的毛細管柱填充物，例如：聚丙烯醯胺[7-9]；聚二甲基乙烯醯胺[10]；纖維素及其衍生物[11-15]和聚環氧乙烷 [16-20]等，都已被成功地運用於 CE 上，來分離 DNA。。除了線性高分子外，非離子型界面活性劑也具有很好的 DNA 分離效果，例如：帶有烷基的聚氧乙烯醚類 C_mE_n [21]或是三嵌段共聚合物 F127, ($EO_{99}PO_{69}EO_{99}$, EO: ethylene oxide, PO: propylene oxide, EPE 型嵌段共聚合物) [22-26]，其中 F127 具有相當程度的黏度可調性，因為這種非離子型界面活性劑具有親水性的 EO 端與疏水性的 PO 端，所以在適當的濃度或是溫度下，會使疏水的 PO 端開始聚集而親水的 EO 端則包覆在 PO 端外面，會形成一個微胞結構，此微胞即具有 PO 的核部分，以及 EO 的殼部分。

在本計畫中，我們以 F127 作為分離介質的主體結構，在適當的濃度下，添加不同濃度不同分子量的較親水性高分子 PEO，以及較疏水性高分子 PPO，利用這些添加物來進一步調節微胞本身核和殼的密度和所形成孔洞大小，以及改變微胞堆積情形，進而造成孔洞分佈的變化。根據文獻[27]我們知道，在 F127 中加入較親水性的高分子 PEO，會使得 F127 的微胞結構變得較鬆散，較不容易形成微胞，

使得 F127 的臨界微胞濃度 (cmc) 升高，而所添加的 PEO 濃度較高時，甚至會使得 F127 無法形成微胞結構，而導致微胞膠體結構崩潰，此時 PEO 的添加會影響到 F127 的黏度，使得 F127 的黏度下降；另一較疏水性的高分子 PPO 的添加所造成的效果，則與 PEO 的添加相反，添加 PPO 會穩定 F127 的微胞結構，使其 cmc 降低，而黏度也會增加。我們所設計的分離介質，如同交連性膠體或高黏度高分子溶液一樣，其網路結構完整，具有高分離解析 DNA 之功能。而且在低溫時具低黏度，有利於注射和更新此介質於毛細管柱中。並且能夠同時扮演分離介質和毛細管內壁塗層材料的雙重角色，使 DNA 分離的解析度更高更有效率。

三、結果與討論

當 F127 的濃度大於臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, cmc) 時，開始形成微胞，而濃度再增加時微胞開始產生堆積，以致使 F127 在室溫下濃度大於 20% 時會因微胞堆積而形成一種膠狀結構。適當濃度的 F127 溶液在低溫時(0~5℃)為低黏度的流體，此時微胞還無法形成，但若將溫度提昇至室溫以上，則因為微胞形成並堆積而成膠狀結構，可見 F127 具有溫度可調整黏度的特性，所以在低溫時即可順利的將其注入毛細管內，而沒有一般高分子水溶液黏度太高的問題，將毛細管柱溫度提昇至室溫，則可形成結構穩固，具解析分離 DNA 的能力。此外 F127 的親水基部分 EO 可和毛細管壁產生親和性作用力[16-18]，所以具有自身塗覆毛細管管壁的效果，故毛細管不需經過額外的塗層處理步驟，即可有效抑制電滲透流（所形成高黏度膠體亦對電滲透流的抑制有主要的貢獻）在完成 DNA 分離步驟後，可以再將毛細管柱溫度下降，使 F127 微胞膠體崩解，而成低黏度流體，此時可將已使用過的 F127 沖洗出毛細管，換裝新的 F127，使 DNA 之分離解析更有再現性。F127 本身的導電度相當小，所以也具備了不易熱裂解的特性，當加高電場時，

電流依然很小，如此即可防止焦耳熱的產生，而在高電場的作用下也可以增加分離的效率。F127 所形成的微胞之親水基的殼部分，以及疏水基的核部分，各形成孔洞大小不一的網狀結構，當微胞進行堆積時，由於球形微胞部分結構重疊，同時也產生部分空隙於相鄰重疊的微胞之間，因此更增加了許多不同孔洞大小的分佈。由於 F127 微胞膠體具有這種多樣化孔洞大小分佈的特性，使得這樣的分離介質具備了很好的分子篩效果。在毛細管電泳中 DNA 的泳動模式會因為其片段長度的不同、所受到的電場強度不同以及所使用的分離介質不同而有所改變。分離介質孔洞太大對大小差異較小的 DNA 無法解析，孔洞太小又會使得大 DNA 在分離介質中所延遲的時間太久而失去解析度。因為 F127 具有上述孔洞大小多樣化及分佈廣的特性，所以將這樣的分離介質應用於 DNA 的分離上，可以達到很好的解析效果，也可以適用於大範圍 DNA 大小的分離上。

我們發現在 25% F127 中加入 10% PEG4000 或 10% PEG8000 後，對 dsDNA 有不錯的分離效果，但 DNA 的 UV 吸收峰次序卻發生嚴重錯亂(Fig 1)。不過，如 Fig 2 所示，當我們在 25% F127 或 25% F127 + 10% PPG400 + 1% PEG400 的分離介質中添加 15 μ g/ml 的溴乙錠（簡稱 EB），則可以得到很好的 dsDNA 分離解析效果，以及正確的吸收峰次序。

另外我們以兩組 ssDNA 為分離樣品（共 20 個片段，其中包括相同長度但不同鹼基組成的 ssDNA），在 25% F127 中可以分別將這兩組 DNA 的 7 個片段以及 13 個片段完全解析開，但是將兩組 DNA 混合後，卻只能解析出 16 根吸收峰(Fig 3)。在增加 F127 濃度以及添加 PEG8000 的一系列實驗中，我們發現，30% F127 + 8% PEG8000 的組成可以將 20 個 ssDNA 片段完全解析開(Fig 4)。在此系統下將電場強度由 200V/cm 增加到 600V/cm，我們發現 DNA 遷移速度變快(Fig 5)，但解析度卻沒有明顯變差，而獲得較高解析效率。

此外，我們針對四種 dsDNA 樣品（其

中包含完全互補、單點鹼基配對錯誤、以及具有兩個鹼基或三個鹼基所形成凸起的 dsDNA），進行毛細管電泳分離，發現在 30% F127 + 12% PEG8000 的組成中加入 20 μ g/ml 的 EB，可以將上述四種 DNA 完全分離開來(Fig 6)，是最佳分離條件。最後我們又設計了兩種 dsDNA 樣品（DNA 片段等長且兩股完全互補，只有一對鹼基對不一樣，即單點突變），來檢驗此系列微胞膠體的高解析能力。從 Fig 7 我們發現，加入適當濃度的正二價離子如： Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 或 Co^{2+} 於 30% F127 + 12% PEG8000 的分離介質中，可以幫助單點突變 DNA 和正常 DNA 之分離解析。

四、計畫成果自評

我們完成了大部分原計畫中之研究項目，並得到豐碩的成果，例如本研究部分成果—“DNA separation in the mixtures of block copolymer and homopolymer by capillary electrophoresis” 已發表於 2003 年 ICCT—Analytical Chemistry, Taiwan. 西文期刊論文發表也已進行中。在學術研究價值方面，本計畫提出的共聚合物所形成的膠束結構，尚未被用於 DNA 之 CE 分離，此研究成果能夠提供在應用此類共聚合物為 DNA 分離介質時的選擇方向，這些結論也可在開拓應用其它種類分離介質時，作為重要的理論依據。在實際應用方面，毛細管電泳分離介質由不同濃度 F127 與 PEO 或 PPO 混合組成，並添加染料分子或二價陽離子，可以應用於包括 SSCP、HDA 和單點突變等 DNA 突變分析。

五、參考文獻

- [1] Li, S. F. Y., *Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications* **1992**, Elsevier, New York.
- [2] Cohen, A. S., Najarian, D. R., Paulus, A., Guttman, A., Smith, J. A., Karger, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 9660-9663.
- [3] Drossman, H., Luckey, J. A., Kostichka, A. J., D'Cunha, J., Smith, L. M., *Anal. Chem.* **1990**, 62, 900-903.
- [4] Cohen, A. S., Najarian, D. R., Karger, B.

- L., *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 49-60.
- [5] Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A. J., Mead, D. A., D'Cunha, J., Norris, T. B., Smith, L. M., *Nucl. Acid. Res.* **1990**, 18, 4417-4421.
- [6] Chiari, M., Nesi, M., Fazio, M., Righetti, P. G., *Electrophoresis* **1992**, 13, 690-697.
- [7] Heiger, D. N., Cohen, A. S., Karger, B. L., *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 33-48.
- [8] Guttman, A., Cooke, N., *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2038-2042.
- [9] Kleemi, M. H., Gilges, M., Schomburg, G., *Electrophoresis* **1993**, 14, 515-522.
- [10] Menchen, S., Johnson, B., Madabhushi, R., Winnik, M., *Progress in Biomedical Optics: Proceedings of Ultrasensitive Biochemical Diagnostics* **1996**. San Jose, CA: SPIE-The International Society for Optical Engineering.
- [11] Grossman, P. D., Soane, D. S., *Biopolymers* **1991**, 31, 1221-1228.
- [12] Baba, Y., Ishimaru, N., Samata, K., Tsuchiko, M., *J. Chromatogr. A* **1993**, 653, 329-335.
- [13] MacCrehan, W. A.; Rasmussen, H. T.; Northrop, D. M. *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, 15(6,7), 1063-1080.
- [14] Kim, Y.; Morris, M. D. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1168-1174.
- [15] Barron, A. E.; Soane, D. S.; blanch H. W. *J. Chromatogr. A* **1993**, 652, 3-16.
- [16] Chang, H.-T., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. B* **1995**, 669, 113.
- [17] Fung, E. N., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1913.
- [18] Iki, N., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. A* **1996**, 731, 273.
- [19] Kasper, T. J.; Melera, M.; Gozel, P.; Brownlee, R. G. *J. Chromatogr.* **1988**, 458, 303-312.
- [20] Guttman, A.; Cooke, N. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2038-2042.
- [21] Wei, W.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1776-1783.
- [22] Wu, C.; Liu, T.; Chu, B. *Electrophoresis*, **1998**, 19, 231-241.
- [23] Rill, R. L.; Locke, B. R.; Liu, Y.; Van Winkle, D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 1534-1539.
- [24] Liang, D.; Chu, B. *Electrophoresis*, **1998**, 19, 2447-2453.
- [25] Rill, R. L.; Liu, Y. D.; Van Winkle, H.; Locke, B. R. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 817, 287-295.
- [26] Miksík, I.; Deyl, Z.; Kasicka, V. *Journal of Chromatography B*, **2000**, 741, 37-42.
- [27] Malmsten, M.; Lindman, B. *Macromolecules* **1993**, 26, 1282-1286.

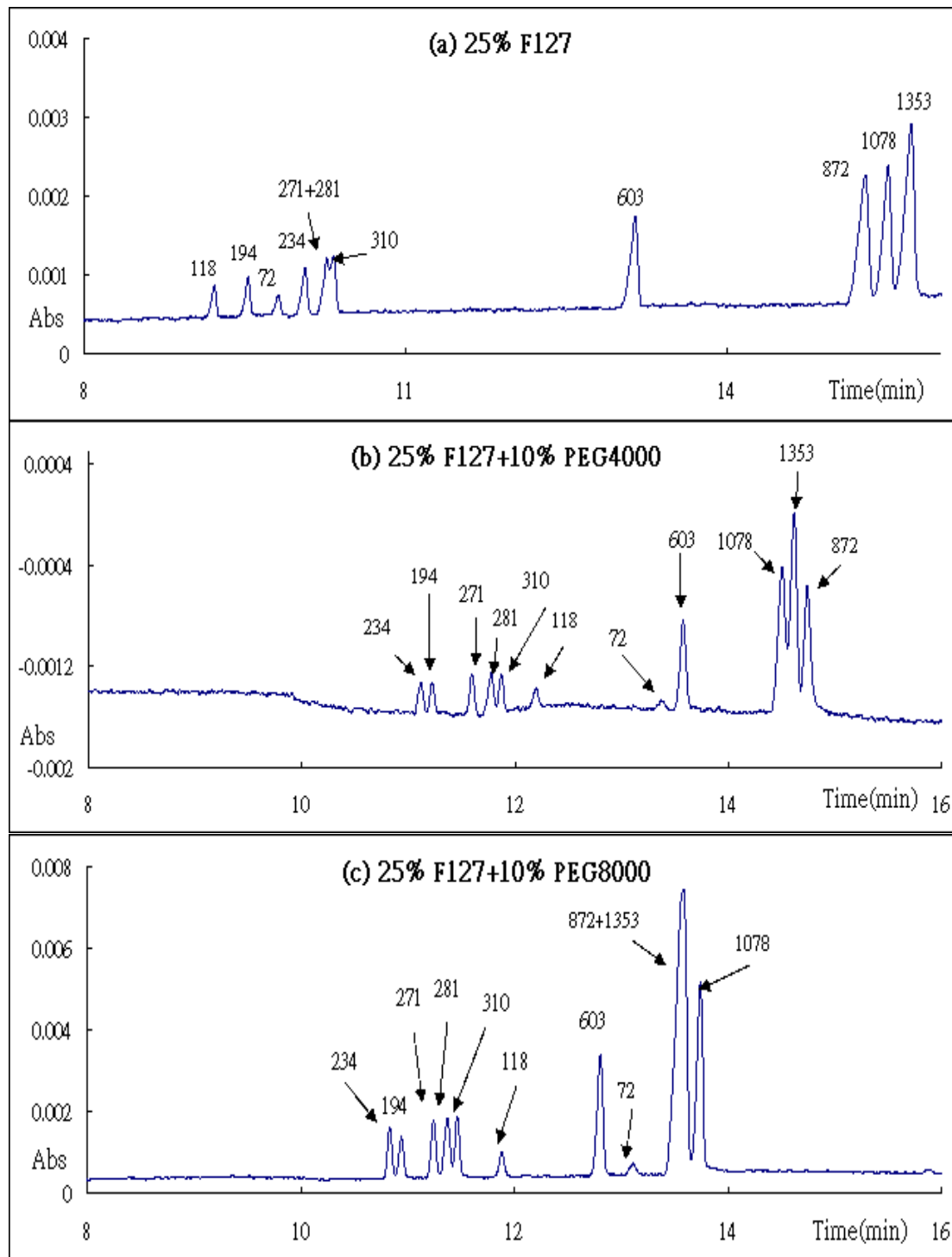


Figure 1 :

毛細管 : $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD= $75\mu\text{m}/364\mu\text{m}$

緩衝溶液 : 1X TBE

樣品 : $50\mu\text{g/ml}$ x174 RFDNA-Hae Digest

進樣 : $8.1\text{ kV}/4\text{ sec}$

分離電場 : 200V/cm

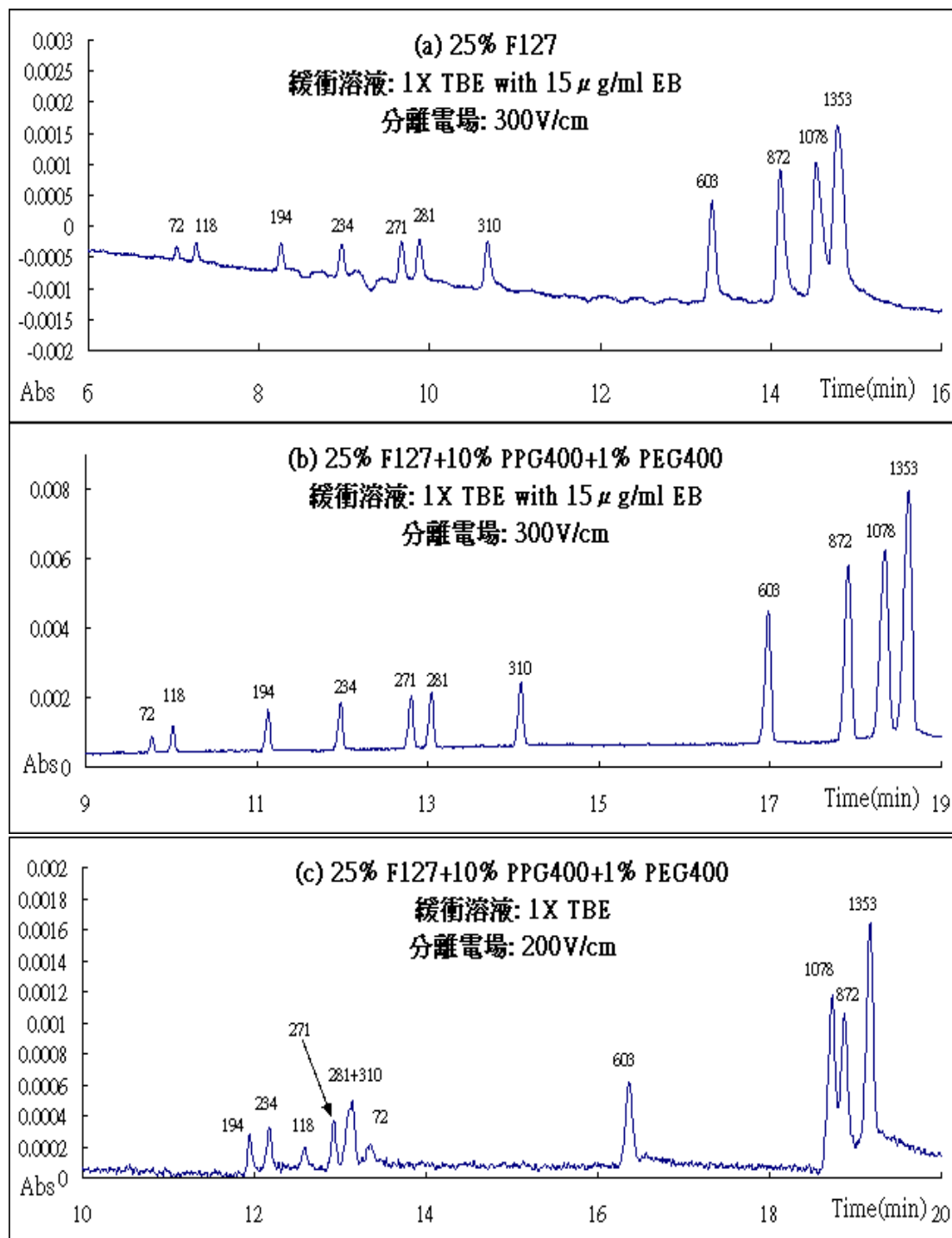


Figure 2 :

毛細管 : $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD= $75\mu\text{m}/364\mu\text{m}$

樣品 : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ x174 RFDNA-Hae Digest

進樣 : 8.1 kV/ 4 sec

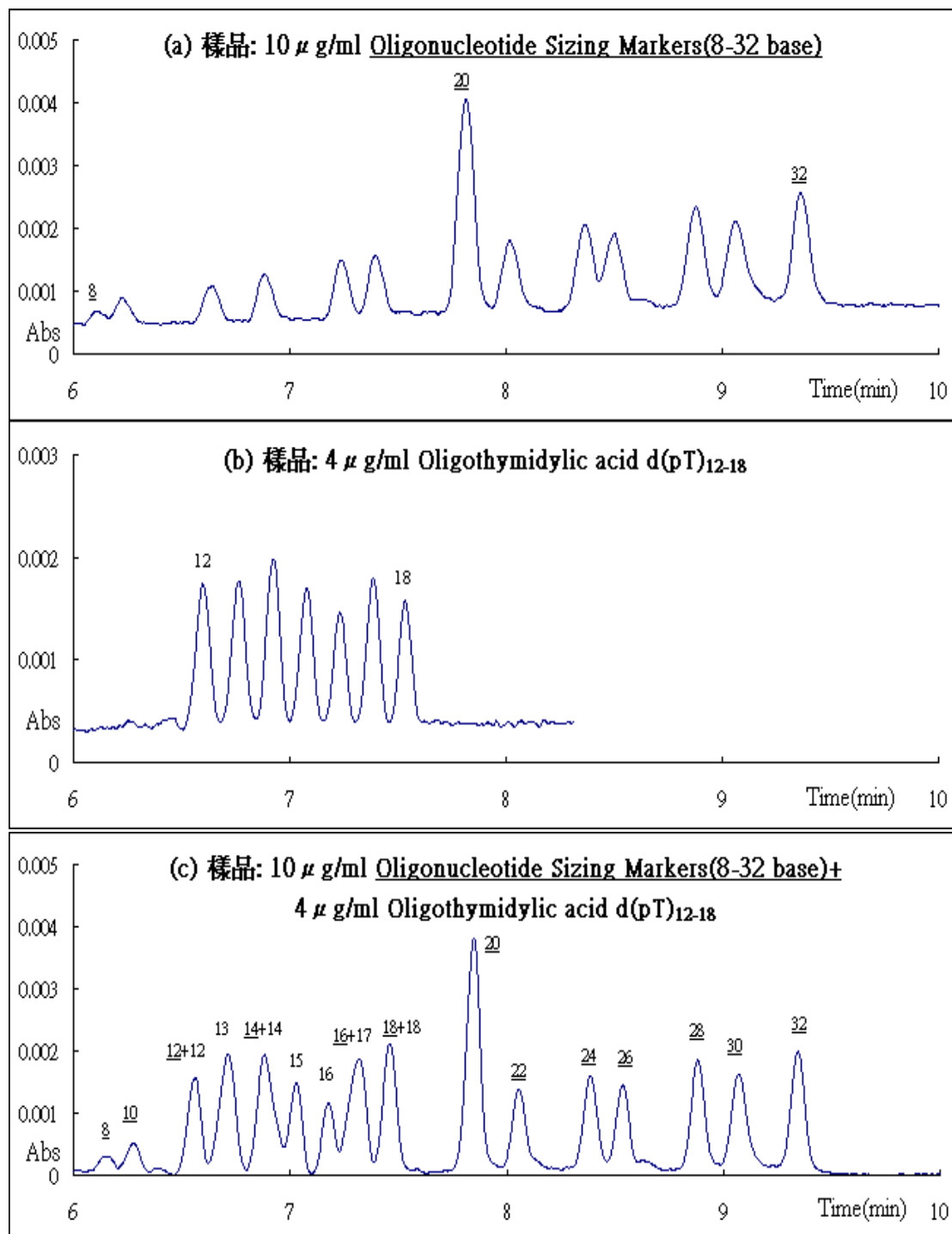


Figure 3 :

毛细管： $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD=75 μm /364 μm
 分离介质：25% F127
 缓冲溶液：1X TBE
 进样：8.1 kV/ 4 sec
 分离电场：200V/cm

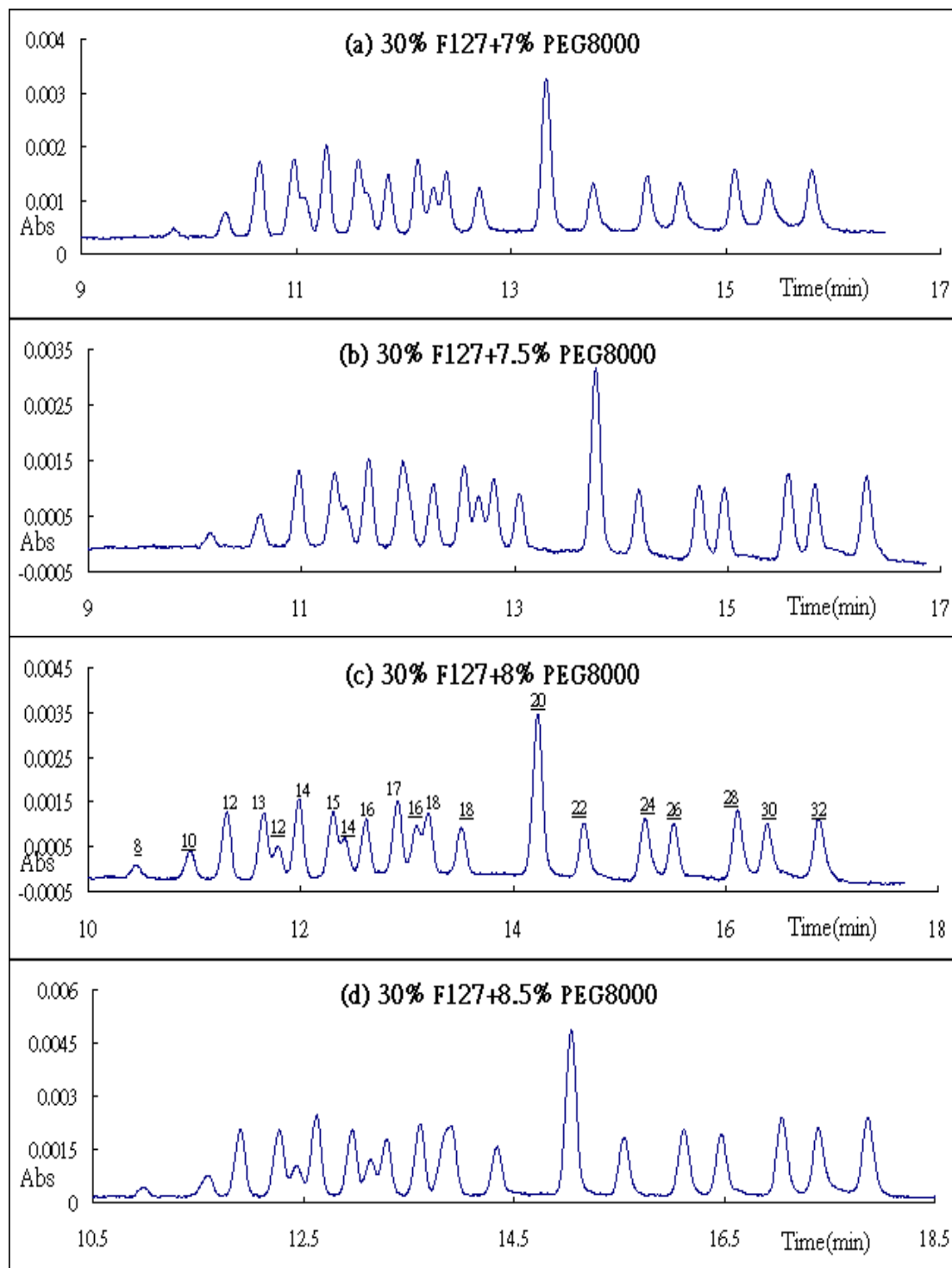


Figure 4 :

毛細管 : $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD= $75\mu\text{m}/364\mu\text{m}$

緩衝溶液 : 1X TBE

樣品 : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligonucleotide Sizing Markers(8-32) with
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligothymidylic acid d(pT)₁₂₋₁₈

進樣 : 8.1 kV/ 4 sec

分離電場 : 200V/cm

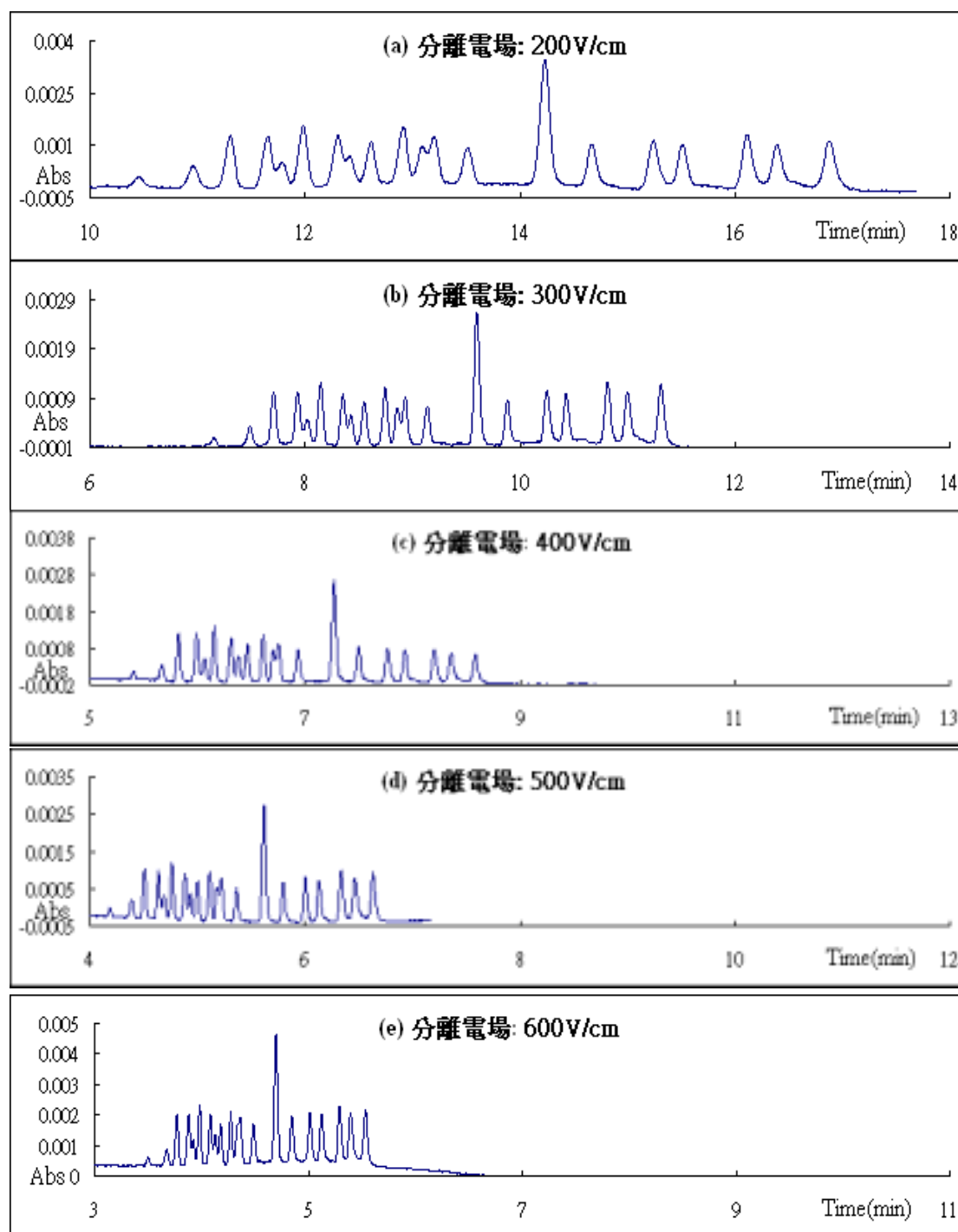


Figure 5 :

毛細管： $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ $ID/OD=75\mu\text{m}/364\mu\text{m}$

分離介質：30%(w/v) F127 + 8%(w/v) PEG8000

緩衝溶液：1X TBE

樣品：10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligonucleotide Sizing Markers(8-32) with
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligothymidylic acid d(pT)₁₂₋₁₈

進樣：8.1 kV/ 4 sec

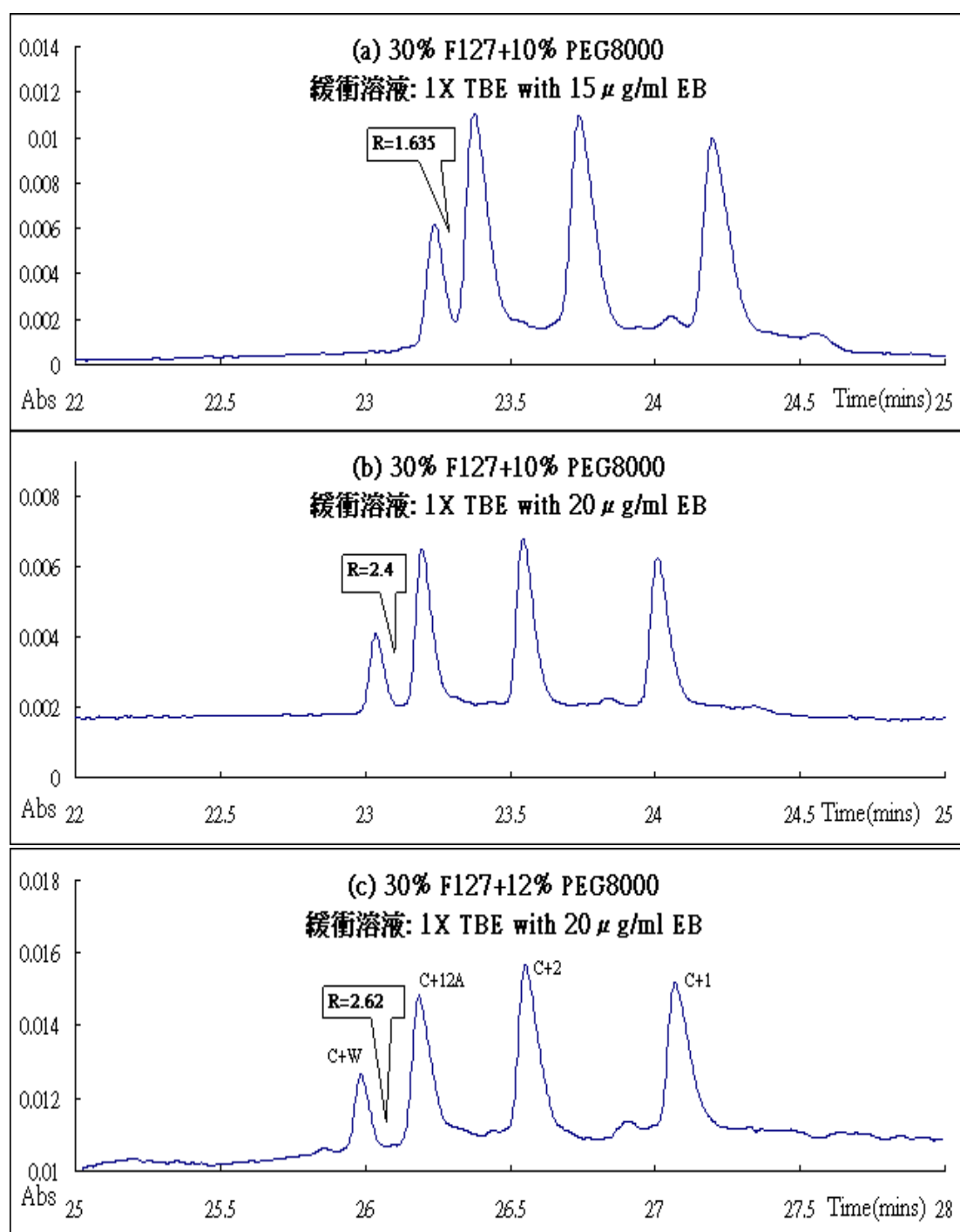


Figure 6 :

毛細管 : $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD=75 μ m/364 μ m

樣品 : 0.1 μ g/ml HPV16-(C+W,C+12A,C+1,C+2)

進樣 : 8.1 kV/ 5 sec

分離電場 : 600V/cm

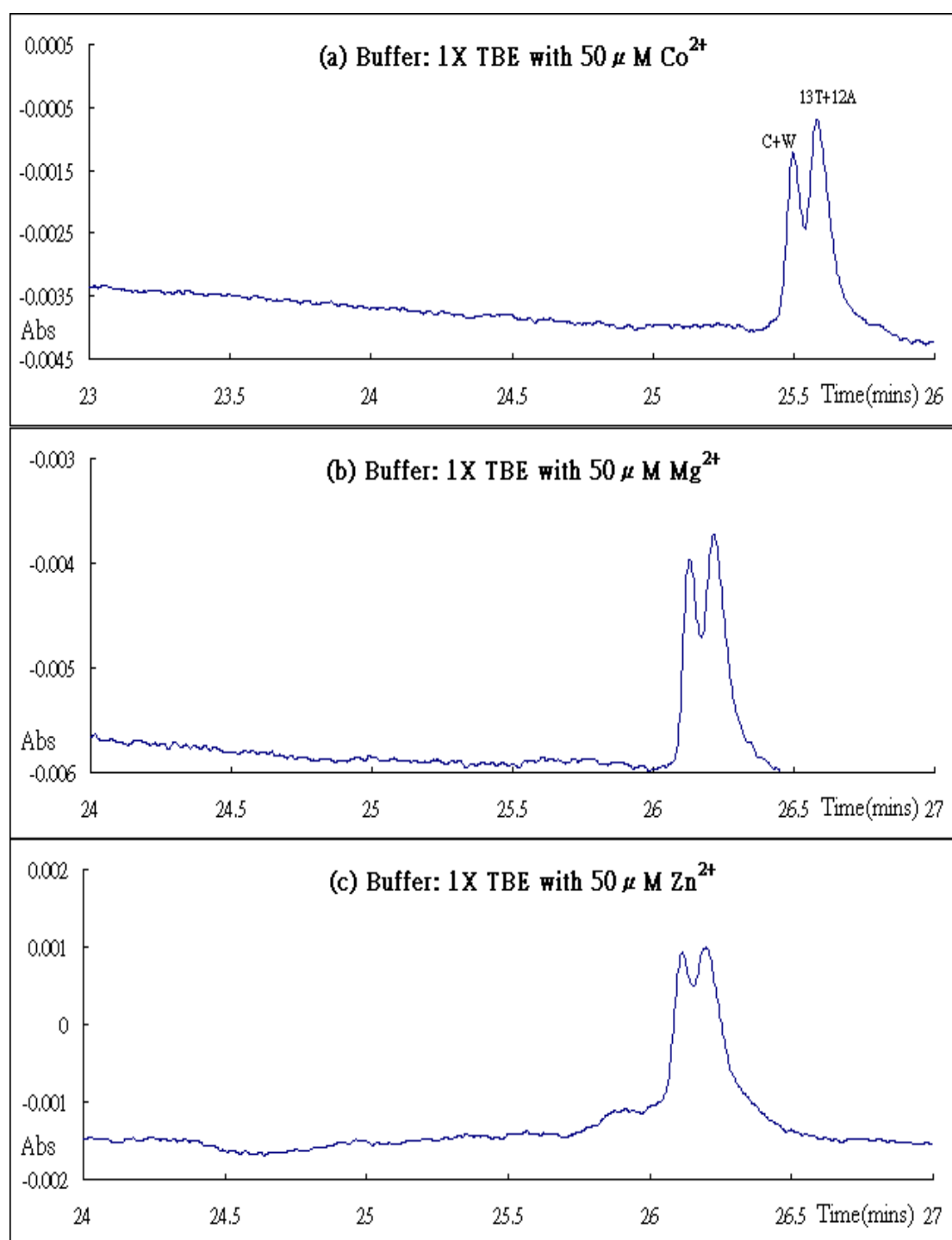


Figure 7 :

毛細管 : $L_t=27\text{cm}$ $L_d=7\text{cm}$ ID/OD= $75\mu\text{m}/364\mu\text{m}$
 分離介質 : 30%(w/v) F127 + 12%(w/v) PEG8000
 樣品 : 0.2 $\mu\text{g/ml}$ HPV16-(C+W,13T+12A)
 進樣 : 8.1 kV/ 5 sec
 分離電場 : 600V/cm